

저분자 히알루론산 및 그 유도체의 합성 및 특성

조석형¹, 김영준², 박판조², 이병우², 조재철³, 모상현⁴
¹혜전대학교 소방안전관리과, ²청운대학교 화장품과학과,
³혜전대학교 호텔조리외식계열, ⁴BIO-FD&C(주)

Preparation and Characteristics of Low Molecular Weight Hyaluronic acid and It's Derivatives

Suk-Hyung Cho¹, Young-Jun Kim², Pan-Jo Park², Byung-Woo Lee²,
Jae-Chul Cho³, Sang Hyun Moh³

¹Dept. of Fire Safty Management, Hyejeon College

²Dept. of Cosmetics Science, Chungwoon University

³Dept. of Hotel Culinary Arts & Food Service, Hyejeon College

⁴BIO-FD&C Co. Ltd., 451-7, Nonhyundong, Namdonggu, Incheon 405-849, Republic of Korea

요 약

Hyaluronic acid(HA)는 보습성, 생체적합성, 고점도성의 특징이 있는 수용성 다당류로 분자량에 따라 보습, 탄성, 점성 등이 달라진다. 또한 피부의 침투성 또한 분자량에 가장 큰 영향을 받는다. 본 연구에서는 HA를 저분자화하여 10만Da-1천Da의 저분자 히알루론산을 제조하고 이를 아세틸화하여 항주름 및 항염활성을 측정된 결과 분자량이 낮은 분자량일 수록 우수한 항주름 및 항염활성을 나타내었으며 아셀틸화한 것이 하지 않은 것에 비하여 높은 항주름 및 항염활성을 나타 내었다.

1. 서 론

인체에서 Hyaluronic acid는 노화와 직접적인 관계에 있으며 수분 함유량의 감소와 피부의 탄력저하가 히아루론산의 감소에 의한 영향이며, 노화의 진행과 함께 일어나는 현상이다. 표피 또한 노화의 진행으로 인해 20%정도의 수분함유량을 유지하지 못한 다면 축축하고 매끄러운 피부를 유지하기 힘들 것이다.2) Hyaluronic acid는 수분증발과, 체내로의 수분유입을 조절해 주는 역할도 하고 있다. 그러나 각질층의 수분함유량이 10%이하로 현저히 떨어질 경우 각질층의 탈락현상으로 인한 거칠기와, 여러 가지 피부 트러블의 원인으로 작용할수 있다. 따라서, 체내의 기전으로 해결이 안되면서 외부적인 보습성분을 연구 발전시키는 중이며, 그중에서 글리세린은 매우 훌륭한 보습제이며 오래전부터 사용되어온 널리 알려진 보습제이다. 현재 널리 사용되는 보습제는 글리세린과 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜과 같은 폴리올류와

아미노산, 젖산염, 피롤리돈 카르보산염 같은 천연보습인자와 히아루론산, 콘드로이친 설페이트, 키토산등의 생체 고분자 물질이 사용되고 있다. 그중 Hyaluronic acid는 보습성과 고점도성, 생체적합성의 특징을 지닌 수용성 다당류의 생체 고분자 물질로써 콜라겐과 엘라스틴 등과 함께 피부의 3대요소이다.3) 히아루론산은 고분자 물질이며, 이번 실험에도 분자량이 150만개인 히아루론산을 사용하였다. 히아루론산은 수용액 상에서 보습, 점도, 탄성을 갖고 있으며, 이성질은 분자량과 농도에 직접적인 관계가 있다. 히아루론산이 피부의 대사과정에 미치는 영향이나, 천연소재로부터 히알루론산이나 콜라겐 대사 제어물질의 탐색에 관한 연구 진행되고 있으며 산분해법과 효소분해법등 히아루론산의 저분자에 대한 연구를 보고하고 있다. 3-1

Hyaluronic acid는 보습성, 생체적합성, 고점도성의 특징이 있는 수용성 다당류로 분자량에 따라 보습, 탄성, 점성 등이 달라진다. 또한 피부의 침투성 또한

분자량에 가장 큰 영향을 받는다. 그러나 히아루론산은 분자량이 수백만에 이르기 때문에 점도도 높고, 피부 침투성이 낮아 기능성이 부족한 단점이 있다. 또한 분자량에 따라 10,000 이하의 저분자화에 있어 안정화에 문제가 있는 것은 사실이다.

따라서 본 연구에서는 히아루론산을 저분자화하였 으며, 저분자화하는데 있어서 pH, 열 등에 높은 점도안정성, 화학안정성이 우수하고 화장품의 타 성분과 상용성이 우수하며, 피부내의 침투력도 우수한 저분자 히아루론산을 제조하였으며 제조한 저분자 히알루론산을 아세틸화하여 유도체를 제조하고 그에 대한 보습성, 세포독성, 항주름활성 등을 연구하였다.

2. 실험

2.1 재료 및 기구

사용된 히알루론산은 (주)더마랩에서 구입하였으며 분자량은 약 150만 이었다. 저분자화에 필요한 효소인 히알루로다제는 시그마제를 구입하였으며 기타 염산, 아세톤, 에탄올, 초산 등의 시약은 1급 시약을 그대로 사용하였다.

2.2 저분자 히알루론산의 제조

히알루론산 10g을 물 500ml에 용해시키고 효소를 0.1%로 첨가한 루 40℃에서 24시간 반응시켰다. 이 반응물 중 미반응물을 여과하고 동결건조 하였다. 얻어진 저분자 히알루론산의 수율이 98%이었다.

2.3 아세틸화 히알루론산(AcHA)

저분자 히알루론산을 아세토니트릴에 용해시킨 후 초산과 에스테르화하여 제조하였다.

2.4 저분자 히알루론산과 아세틸화 저분자 히알루론산의 세포독성

세포를 24 well에 1×10^4 cell/well로 분주 한 후 세포배양 조건에서 confluence가 50~60%에 도달할 때까지 배양 한다. 배지를 버리고 10% PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 다음 10% FBS가 포함하지 않는 새로운 배지를 넣고 일정농도의 시험물질을 처리하여 48시간 추가 배양한다. MTT 용액(6.6mg/ml, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2yl)-2,5 diphenyl-2H-tetrazolium bromide액)을 각 well에

50ul씩 넣고 3시간 추가 배양한다. 배양액을 제거한 다음 dimethylsulfoxide(DMSO, Amresco, 0231-500ML)를 200ul씩 넣고 10분간 흔들어 준 다음 100 μ l씩 96well에 취하여 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) reader로 540nm에서 흡광도를 측정한다. 세포 독성 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 백분율로 표시하였다.

$$\text{세포안정성(\%)} = (\text{시험군의 흡광도/대조군의 흡광도}) \times 100$$

2.5 저분자 히알루론산과 아세틸화 저분자 히알루론산의 항주름 효과

Antibody-POD conjugate solution 100 μ l를 각 well에 넣은 다음 LMHA-1, LMHA-2, LMHA-3, LMHA-4, LMHA-5, LMHA-6, LMHA-7 시료 및 표준액 20 μ l를 넣고 37℃에서 3시간 배양하였다. well에서 배양액을 제거한 다음 Ice-cold PBS(phosphated buffer saline) 400 μ l로 4회 washing한다. 발색시약인 substrate를 100 μ l loading 하고, 실온에서 15분간 반응시킨 후, 반응의 Stop solution인 1N H₂SO₄ 100 μ l loading 후, 450nm에서 microplate reader로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 저분자 히알루론산 및 아세틸 저분자 히알루론산의 제조

히알루론산을 효소분해하여 제조한 결과 표 1과 같은 결과를 얻었으며 이를 아세틸화하였다.

[표 1] 저분자 히알루론산의 제조 및 아세틸화 저분자 히알루론산의 제조

| 시료명 | 반응시간 (hrs.) | 분자량 (Mw) | 분자량분포 (PD) | 성상 |
|--------|-------------|----------|------------|----|
| LMHA-1 | 0 | 1500000 | - | 백색 |
| LMHA-2 | 6 | 5200 | 2.1 | 백색 |
| LMHA-3 | 12 | 900 | 2.2 | 백색 |
| LMHA-4 | 24 | 114000 | 1.6 | 백색 |
| LMHA-5 | 6 | 5200 | 2.1 | 백색 |
| LMHA-6 | 12 | 900 | 2.2 | 백색 |
| LMHA-7 | 24 | 114000 | 1.6 | 백색 |

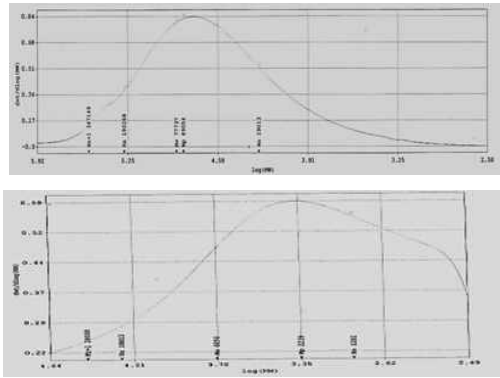


그림 2. 저분자 히알루론산의 GPC profile

3.2 저분자 히알루론산 및 아세틸 저분자 히알루론산의 기능성

피부세포 안전성 *in vitro* 시험(MTT)

인간각질형성세포주인 HaCaT에서의 시료 AcHA 고분자, LMHA-11-1, LMHA-14, LMHA-16, Ac LMHA-11-1, Ac LMHA-14, Ac LMHA-16-1의 세포 안전성을 평가하였다. 그 결과는 AcHA 고분자, LMHA-11-1, LMHA-14, LMHA-16, Ac LMHA-11-1, Ac LMHA-14, Ac LMHA-16-1 시료의 0.5 %, 1.0 % 농도에서 대조군과 비교하여 독성을 보이지 않았다.

표 2. 저분자 히알루론산 및 아세틸화 저분자 히알루론산의 피부세포 안전성

| 시료명 | 처리농도 | Cell Proliferation Effect (%) |
|---------|-------|-------------------------------|
| control | | 100 |
| LMHA-1 | 0.5 % | 99.1 |
| | 1.0 % | 100 |
| LMHA-1 | 0.5 % | 99.5 |
| | 1.0 % | 98.3 |
| LMHA-2 | 0.5 % | 107.9 |
| | 1.0 % | 100.3 |
| LMHA-3 | 0.5 % | 111.5 |
| | 1.0 % | 101.6 |
| LMHA-4 | 0.5 % | 97.7 |
| | 1.0 % | 95.8 |
| LMHA-5 | 0.5 % | 100.4 |
| | 1.0 % | 95.6 |
| LMHA-6 | 0.5 % | 104.5 |
| | 1.0 % | 98.7 |

항주름 활성

인간섬유아세포주인 CCD986-SK에서의 LMHA-1, LMHA-2, LMHA-3, LMHA-4, LMHA-5, LMHA-6, LMHA-7 시료의 Procollagen Type I C-Peptide 합성 영향 정도를 1.0 % 의 처리 농도에서 처리한 배양액을 얻어 ELISA assay로 확인하였다. 그 결과, Ac LMHA-5, LMHA-6에서 PIP의 합성량을 증가함

을 확인하였다.

| 시료명 | 처리농도 | Procollagen Type I C-Peptide(PIP) 합성량 (ng/ml) |
|---------|-------|---|
| control | | 128.75 |
| LMHA-1 | 1.0 % | 213.75 |
| LMHA-2 | 1.0 % | 216.87 |
| LMHA-3 | 1.0 % | 121.87 |
| LMHA-4 | 1.0 % | 131.87 |
| LMHA-5 | 1.0 % | 247.5 |
| LMHA-6 | 1.0 % | 323.12 |
| LMHA-7 | 1.0 % | 185.00 |

항염 활성

Raw264.7 에서 AcHA 고분자, LMHA-11-1, LMHA-14, LMHA-16, Ac LMHA-11-1, Ac LMHA-14, Ac LMHA-16-1 가 NO의 발현에 어떤 영향을 미치는지 EILSA Kit을 이용하여 시험하였다. NO를 감소시킨 것이 LMHA-1, LMHA-2, LMHA-3, LMHA-4, LMHA-5, LMHA-6, LMHA-7 각 시료 처리에 의한 세포독성으로 인한 세포의 수적저하에 기인하였는지를 관찰하기 위하여 각 시료물질들의 MTT assay를 통한 Cell Viability도 측정하였다. LPS처리군은 대조군에 비해 세포생존율은 처리 농도 0.5 %, 1.0 % 까지 거의 비슷하게 90 % 이상의 Viability를 보였다.

(자사 기준 : cell viability 80% 이상을 독성이 없는 범위로 간주)

따라서, LMHA-1, LMHA-2, LMHA-3, LMHA-4, LMHA-5, LMHA-6, LMHA-7 시료 중 LMHA-5, LMHA-6 처리시 NO생성량이 두드러지게 줄어들음을 확인할 수 있어, 항염 효과에 좋은 것으로 보인다.

| 시료명 | 처리 농도 (%) | Cell Viability (%) | NO Production (µM) |
|----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|
| control | control | 100 | 1.4 |
| | control | 98 | 3.3 |
| | control | 99.1 | 3.4 |
| LMHA-1 | 0.05 | 99.1 | 3.4 |
| | 1.0 | 100 | 3.33 |
| LMHA-2 | 0.05 | 99.5 | 3.4 |
| | 1.0 | 98.3 | 3.2 |
| LMHA-3 | 0.05 | 107.9 | 3.3 |
| | 1.0 | 100.3 | 3.5 |
| LMHA-4 | 0.05 | 111.5 | 3.5 |
| | 1.0 | 101.6 | 3.6 |
| LMHA-5 | 0.05 | 97.7 | 2.9 |
| | 1.0 | 95.8 | 2.5 |
| LMHA-6 | 0.05 | 100.4 | 2.6 |
| | 1.0 | 95.6 | 2.2 |
| LMHA-7 | 0.05 | 104.5 | 3.4 |
| | 1.0 | 98.7 | 3.3 |
| Incomethacin (100µM) | Incomethacin (100µM) | 97.6 | 2.7 |